アジレント
アラビドプシス 1
マイクロアレイ
ハイブリダイゼーション
プロトコル

ユーザーズガイド

アラビドプシス 1（製品番号　G4135A）

Version 1.0J
2002 年 7 月

キットに添付されているキット構成リストと
保管時の注意事項を必ずご確認ください。

アジレントシュアプリントテクノロジーで製造したマイクロアレイ
注意：このキットは研究用です。

Agilent Technologies

部品番号

G4135-96000

改訂履歴

2002年7月 英語版version1.0をもとに日本語化

テクニカルサポート

日本における販売及び技術サポートは、横河アナリティカルシステムズ株式会社 フリーダイアル
0120－477－111までご連絡ください。
またはアジレント関連製品の詳しい情報は次のURLでご覧になれます。
www.agilent.com/chem/dnasupport

テクノロジーライセンス

本品は研究用です。臨床検査用ではありません。

制限的ライセンス

本ライセンスは、核酸アレイ（以下、アレイという）を購入した個人または法人（以下、購入者という）に対し、アレイおよびアレイの使用により得られたデータを、購入者が所属する組織内部における発現遺伝子の同定および／または遺伝子発現量の調査にのみ使用することを、Agilent Technologies, Inc. が許諾するものです。購入者は、本ライセンスでは以下を行うことを許諾されていないことに同意します。

(a) アレイおよびアレイから得られたデータを、発現遺伝子の同定および遺伝子発現量の調査以外の目的に使用すること。

(b) アレイおよびアレイから得られたデータを、遺伝子多型解析のために使用すること。

(c) 臨床検査において、ある特定の個人の試料をアレイを使って分析して得られたデータが当該個人本人またはその個人の介護者の知り得るような状況において使用すること。

Agilent Technologies, Inc. および同社に使用許諾をしている第三者はいずれも、明示暗示を問わず、アレイ、その他アレイおよびアレイ上の核酸の製造、使用、販売および輸入を許諾するライセンスを供与するものではありません。購入者は、本ライセンスにより、アレイの使用により得られたデータを第三者に販売することはできません。

注意 本マークは、無視して取り扱いを誤った場合、物的損害が発生する潜在的危険の存在を示しています。

目次

1．はじめに 4

キットの内容 5
キット以外で必要な試薬 5
必要な機器・器具 5
安全上の注意 6
実験上の一般的な注意 7
マイクロアレイの取り扱い上の注意 7

2．ハイブリダイゼーションプロトコル 8

ターゲット試料の調製とラベル化 8
ハイブリダイゼーション溶液の調製 9
ラベル化cDNAとマイクロアレイのハイブリダイゼーション 9
スライドグラスの洗浄 10
スライドグラスの乾燥 11
ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの画像化 12

※お手持ちのスキャナがアジレントの製品でない場合は、アレイの読み取り方向によって
アレイのデザインのレイアウトが変わりますので、必ず画像化の章と付録をご確認ください。

付録 14

付録1：アラビドプシス RNAの調製 14
付録2：マイクロアレイのレイアウトと向き 15
付録3：アラビドプシス1 マイクロアレイ 17

1
はじめに

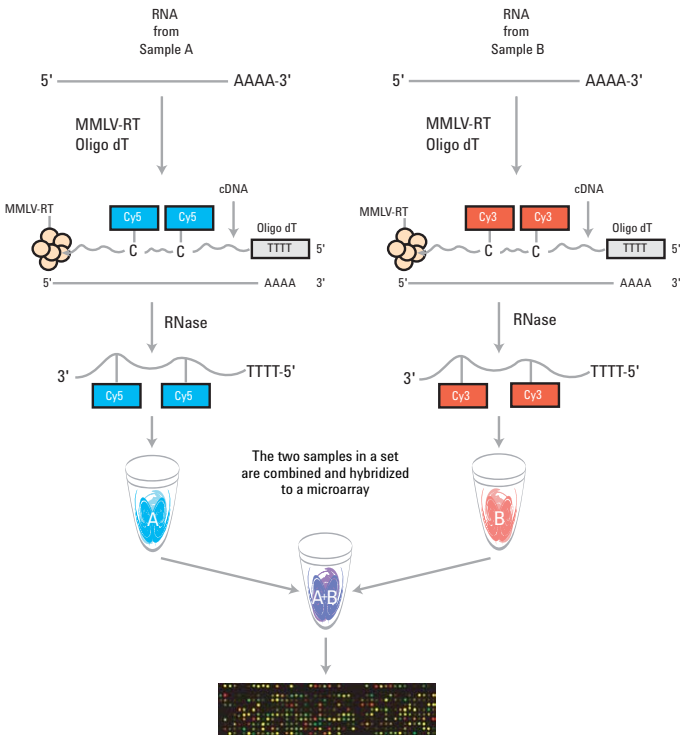
アジレントのアラビドプシス1マイクロアレイ(G4135A)は、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana*のゲノムワイドな発現解析のために、1万数千の遺伝子のシーケンスから選択された60merのオリゴヌクレオチドプローブを搭載したマイクロアレイです。これらのオリゴヌクレオチドのプローブは、マイクロアレイ上に独立したスポット(以下フィーチャと呼ぶ)として載っており、それぞれ異なる遺伝子(TIGR ID番号)に対応しています。1×3インチのスライドグラス上に同一のアレイが2つプリントされており、キットには合計で4つのマイクロアレイ(スライド2枚)が含まれています。

キット付属のコンパクトディスク(CD)には、各オリゴヌクレオチドプローブとスライドグラス上のスポット位置をリンクするデザインファイルが収録されています。マイクロアレイ上の各オリゴヌクレオチドプローブは、公的データベース(TIGR)にその遺伝子のシークエンスが登録されています。添付CDのアレイデザインファイルに、各オリゴヌクレオチドプローブの遺伝子名、TIGR ID番号(locus ID)、アジレントID番号が記載されています。TIGR ID番号はTIGRデータベースのアップデートにより、異なるシークエンスに変更になることがあります。アジレントID番号は常に同じオリゴヌクレオチドプローブに対応しています。アジレントID番号とTIGR ID番号の組み合わせはアジレントのホームページで公開されています。

本プロトコルはアジレントアラビドプシス1マイクロアレイの取り扱い説明書です。本キットは生物学的に異なる2つの試料間の遺伝子発現の違いを、相対的に比較する実験のために作成されています。2つの試料から抽出したRNAを用いて、ラベル化されたターゲットcDNAを合成し、競合的にマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせます。アジレントはラベル化反応用のキットとして、アジレントcDNAラベル化キット(製品番号G2557A)とPerkin-Elmer / NEN Cyanine 3及びCyanine 5 dCTPの使用を推奨しています。(キットに添付されている葉書に、3バイアル分のCyanine試薬のラベルを貼り、葉書記載の宛先までお送りいただくと、1バイアルを無償でお送りするキャンペーンを実施中です。キャンペーン予定期間:2002年12月まで)

下の図は、ラベル化からハイブリダイゼーションまでを図式化したものです。

実験を成功させるために、実験を始める前に必ず本プロトコル全体に目を通してください。



キットの内容

・マイクロアレイ 4（スライドグラス2枚）
・アラビドプシス1マイクロアレイハイブリダイゼーション ユーザーズガイド（本書）
・フィーチャ（スポット）情報が記載されたCD-ROM
・製品データ シート
・2× ラージボリュームハイブリダイゼーションバッファ（900 μl）

※室温、暗所で保管してください。

キット以外で必要な試薬

・Cyanine 3とCyanine 5でラベル化したcDNAサンプル
・DNase/RNaseフリー水（ヌクレアーゼフリー水）　（Invitrogen, cat. no. 10977-015）
・10% SDS（Invitrogen, cat. no. 15553-027）
・20 × SSC（Amresco, cat. no. 0804）
・超純水（MilliQ 水）　（MilliQ水はヌクレアーゼフリーが保証されているわけではありません。不適切な管理がされているMilli-Q水は、ヌクレアーゼで汚染されていることがあります。お使いになる前にMilliQ水の品質をお確かめください。）
・Human Cot-1 DNA, 1 mg/ml（Invitrogen, cat. no. 15279-011）
・デポジションコントロールターゲット（Operon, cat. no. SP300）

注意 デポジションコントロールターゲットは、60 μlのヌクレアーゼフリー水で溶解し、－20℃、暗所で保存してください。

必要な機器・器具

・ハイブリダイゼーションオーブン（Robbins Scientific, モデル400AG, 設定温度60℃）
・アジレントハイブリダイゼーションチャンバー用ローター（Agilent, cat. no. G2533-60020）
（上記オーブンに取り付けて使用）
・ハイブリダイゼーションチャンバー、16.2K用（G2533A）
（消耗品：バッキング、ガスケット、セプタ10セット含む）
・ポリプロピレン製バッキング、ガスケット、セプタ（Agilent, cat. no. G2533-65002）
・ハイブリダイゼーションチャンバー　クイックスタートガイド（16.2K用：G2533-95001）　※チャンバーに付属しています。
・パウダーフリー手袋
・ピンセット
・マイクロピペッター（0.1 μlから1 mlの範囲）
・1.5 mlエッペンチューブ（滅菌済ヌクレアーゼフリー）
・ピペットチップ（滅菌済ヌクレアーゼフリー）
・1 ml シリンジ（Becton- Dickinson, cat. no. 309602、または同等品）
・25ゲージ 5 / 8" 針（Becton- Dickinson, cat. no. 305122、または同等品）
・0.2 μm フィルターユニット（1000 ml）
・遠心機
・ボルテックス ミキサー
・氷浴
・ウォーターバス

・ヒートブロック（設定温度98℃）
・スライドグラス洗浄バットとスライドラック（Thermo Shandon, cat. no. 121）
・スターラー（2）
・回転子（2）
・エアーダスター
・遠心器（スライドグラス乾燥用：96穴プレート用のローター）
・マイナスドライバー

安全上の注意

・実験にあたっては、必ずご所属のラボの安全ガイドに従ってください。
・スライドの縁は鋭利です。手袋ははめ、十分注意して取り扱ってください。
・針の先は鋭利です。十分注意して取り扱ってください。また適切に処分してください。
・Cyanine 3-dCTPとCyanine 5-dCTPは発癌性物質を含んでいます。吸引、誤飲、皮膚への直接の接触はさけてください。
・デポジションハイブリダイゼーションバッファには、塩化リチウム（LiCl）とラウリル硫酸リチウム（LLS）が含まれています。
・塩化リチウム（LiCl）には中枢神経系への毒性があります。催奇性があり、乳児に悪影響を与える可能性があります。また不妊を誘発する可能性があります。吸引、皮膚接触、誤飲により、害を引き起こします。必ず適切な白衣、手袋、マスク、防護メガネ等を着用してください。
・ラウリル硫酸リチウム（LLS）は毒性があり、目、気管器系、皮膚に炎症を起こす可能性があります。必ず適切な白衣、手袋、マスク、防護メガネ等を着用してください。
・接触した場合には医師のアドバイスを受けてください。
・これらのMaterial Safety Data Sheets（MSDSs）は、アジレント社のWEBから入手することができます。www.chem.agilent.comにアクセスし、Quick Search boxでMSDSを、Product NumberにG4135-60510を入力してください。

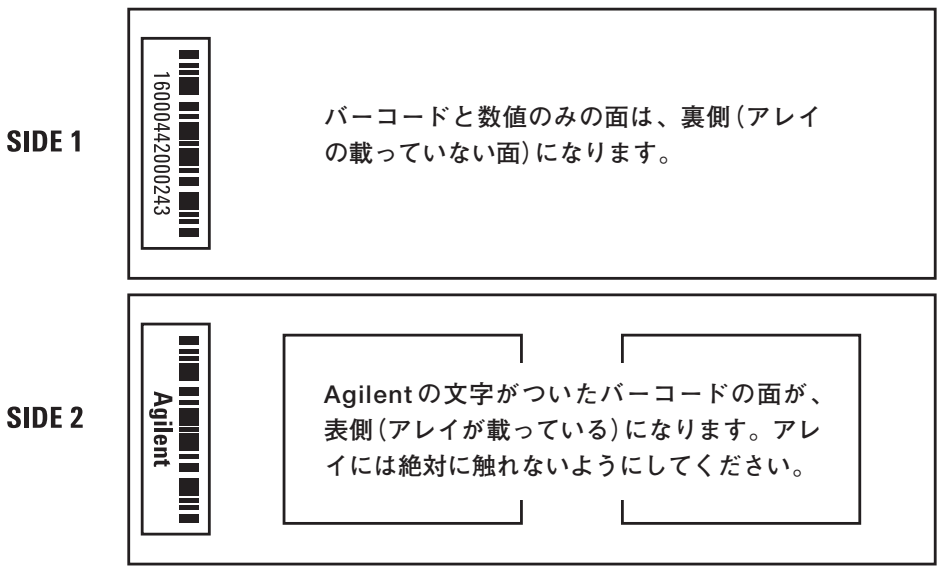
実験上の一般的な注意

・ご所属のラボの安全ガイドに従ってください。
・実験エリアは常に清潔にしてください。
・RNaseの汚染を避けるために、実験中はパウダーフリーの手袋を着用してください。またヌクレアーゼフリーの溶液、ピペットチップを使用してください。
・Cyanine 3及びCyanine 5は光で分解します。出来る限り光にあたらないように注意して使用してください。保管時、反応時は必ず遮光してください。

マイクロアレイの取り扱い上の注意

・1枚のスライドには2つのマイクロアレイが載っています。アレイはAgilentとラベルされたバーコードの面にプリントされています。

両面にバーコードがついたスライドグラスの例



・マイクロアレイのレイアウトやサイズなどの詳細な情報については、付録をご参照ください。
・スライドグラスを取り扱う際はパウダーフリーの手袋をはめ、スライドグラスの縁を注意深く持って取り扱ってください。**スライド表面には両面とも決して触らないでください。マイクロアレイに修復できないダメージを与える可能性があります。**
・ハイブリダイゼーション、洗浄のステップでアレイを乾燥させないように注意して下さい。
・ハイブリダイゼーションを開始する前に、オーブンがあらかじめ60℃に設定されていることをお確かめください。

2
ハイブリダイゼーション プロトコル

実験を始める前に必ず本プロトコル全体に目を通してください。

ターゲット試料の調製とラベル化

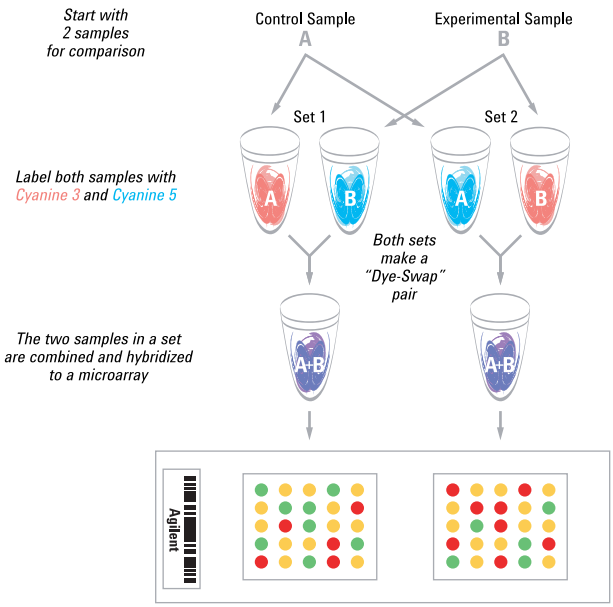
アジレントのアラビドプシス1マイクロアレイは、2色の蛍光でそれぞれラベル化した試料をアレイに競合的にハイブリダイゼーションさせ、遺伝子発現をモニターするためにデザインされています。アジレントのDNAマイクロアレイスキャナを使用した場合に、性能を最大限発揮するように最適化されていますが、市販のマイクロアレイスキャナ(1×3"スライドグラス対応)で画像を読み取ることもできます。アジレントでは、2種類の異なるRNA試料をそれぞれCyanine 3とCyanine 5を用いてラベル化し、これらのラベル化cDNAを混合してアレイに競合的にハイブリダイゼーションさせるプロトコルを推奨しています。RNAの調製方法については、付録の項をご参照ください。

ラベル化cDNA試料の調製には、多種多様なキットが市販されています。これらのほとんどはpoly-A RNAからラベル化cDNAへの逆転写反応を利用しています。アジレントではアジレントcDNAラベル化キット(製品番号G2557A)の使用を推奨しています。このキットは、total RNAまたはpoly-A RNAからCyanine 3とCyanine 5でラベル化されたcDNAを得るのに必要な試薬とプロトコルを含んでいます。ラベル化反応に続いて、Cyanine 3とCyanine 5でラベル化した2つの試料を混合、濃縮し、ハイブリダイゼーションします。直ちにハイブリダイゼーションに使用しない場合は、使用するまで－80℃で冷凍保存してください。

注意 アジレント製品以外のラベル化キットを使用する場合：アジレント社のマイクロアレイ表面は、EDTAに対して非常に敏感です。ラベリングしたサンプルを含むハイブリダイゼーション溶液中には、EDTAが存在しないように調製してください。

正確な発現比を得るためには、蛍光色素に由来するスポット信号の強度差(色素バイアスと呼ばれる。主に、ラベル化反応時の色素の取り込み効率の違いに由来する)を除去することが重要です。アジレントではこの色素バイアスを補正するために、カラースワップを推奨しています。(例えば、アレイ1には試料AをCyanine 3で、試料BをCyanine 5でラベル化してハイブリします。アレイ2では色素を入れ替えて、試料AをCyanine 5で、試料BをCyanine 3でラベル化してハイブリします。)カラースワップしたそれぞれのスポット信号の結果を平均することで、色素バイアスの影響を最小限にして、より正確な発現レベルの差を求めることができます。

マイクロアレイのカラースワップの実験法



ハイブリダイゼーション溶液の調製
(所用時間：10分／tube)

注 意 ハイブリダイゼーションオーブンは事前に必ず60℃に設定してください。

1. デポジションターゲットを解凍し、氷上に置いておきます。
   ＊デポジションターゲットの調製法は「キット以外で必要な試薬」の項をご覧ください。
2. Cyanine 3とCyanine 5でラベル化したターゲットcDNA(両試料は事前に混合し、溶媒を乾燥させておきます)にヌクレアーゼフリー水93.75 μlを加え、ピペットで吸引排出を繰り返し溶解させます。ラベル化サンプルを乾燥させていない場合は、ヌクレアーゼフリー水を加えて、最終量が93.75 μlになるように調製します。
3. 上記の93.75 μlの水に溶解したcDNAに以下の試薬を加え、ハイブリダイゼーションミックスを調製します。
   ・2.5 μl　デポジションコントロールターゲット
   ・3.75 μl　Cot-1 DNA
   ・100 μl　2× デポジション ハイブリダイゼーションバッファ
4. ハイブリダイゼーションミックスをよく混合し、98℃で2分間インキュベーションします。その後、遮光下で室温に戻します。
5. ハイブリダイゼーションミックスを14,000rpmの回転数で5分間遠心にかけます。

ラベル化cDNAとマイクロアレイのハイブリダイゼーション
(所用時間: 15分／chamber + ハイブリダイゼーション17時間)

注 意 各マイクロアレイに正しいサンプルをハイブリダイゼーションさせるために、ハイブリダイゼーションチャンバーに番号をつけることをお奨めします。

6. **ステップbyステップの詳しい操作説明はAgilent *In Situ* ハイブリダイゼーションチャンバー クイックスタートガイド(16.2Kフォーマット用)をご参照ください。**
7. チャンバーに正しくセットした各マイクロアレイのセプタに、25ゲージの針を刺し込みます。マイクロアレイごとに2つセプタがありますが、どちらか一つに針を刺し込んでください。
   ・セプタの中心は空洞になっています。正しい位置に針を刺し込むと、抵抗感は感じません。
   ・この針はハイブリダイゼーションソリューションを注入するときの「空気の抜け道」となります。
8. 1 mlのシリンジに別の針を取り付けます。
9. 静かにゆっくりとハイブリダイゼーション溶液をシリンジで吸い込みます。この時、泡ができないように十分に注意してください。
   ・それぞれのマイクロアレイに必要なハイブリダイゼーション溶液は200 μlです。各マイクロアレイはスライドに2枚プリントされています。
10. 高速遠心機でチューブをスピンダウンさせます。蓋や壁についたハイブリダイゼーション溶液をチューブの底に集めます。残っている液をさらにシリンジで吸い込みます。
11. ゆっくりとシリンジの針を(ステップ7で針を取り付けていないほうの)セプタに刺し込みます。ハイブリダイゼーションソリューションをチャンバーの中に入れます。
    ・針は確実にセプタの中心部に刺し込んでください。セプタの中心は空洞になっていますので、正しい位置に針を刺し込むと、抵抗感は感じません。
    ・チャンバーの中を見ながら、泡が入っていかないように注意してハイブリダイゼーションソリューションを入れます。液量はアレイ全体の2/3程度になります。

12. 液を入れ終わったら、セプタから針を取り除きます。使用済みの針は、適切な方法で処分してください。
13. 残りのアレイも同様に、7－12のステップを繰り返します。
14. 泡が自由に動くことができるかどうか、チャンバーを回転させてみて確認します。
15. ハイブリダイゼーションチャンバーをあらかじめ60℃に設定したオーブンのローターに差し込みます。チャンバーがローターにしっかり固定されて回転できることを確認します。
16. ハイブリダイゼーションローターの扉を閉め、**回転数を8に設定します。**
17. 他のスライドも同様にハイブリダイゼーション溶液を入れます。
18. 60℃で17時間ハイブリダイゼーションさせます。

注意 実験間の結果を一致させるために、ハイブリダイゼーションの時間は常に同じ長さになるようにしてください。

スライドグラスの洗浄
(所用時間：10分／tube)

19. 以下の洗浄バッファを用意します。

A. 洗浄バッファ1： 0.5 × SSC, 0.01% SDS

i) 沈殿の生成を避けるために、以下の順番で試薬を混合してください。

試薬	量(ml)
Milli-Q 水	974.0
10% SDS	1.0
20 × SSC	25.0
合計	1000.0

ii) 混合液を0.2 μ mフィルターユニットを使い濾過します。

iii)バッファは室温で保存します。

B. 洗浄バッファ2： 0.06 × SSC

i) 以下の順番で試薬を混合してください。

試薬	量(ml)
Milli-Q 水	997.0
20 × SSC	3.0
合計	1000.0

ii) 混合液を0.2 μ mフィルターユニットで濾過します。

iii)バッファは室温で保存します。

20. 洗浄バッファ1(0.5 × SSC, 0.01% SDS)を入れたスライドグラス洗浄バットを2つ用意します。1つのバットにはスライドラックと回転子を中に入れておきます。
    バット1：洗浄バッファ1
    バット2：洗浄バッファ1、スライドラック、回転子
21. 洗浄バッファ2(0.6 × SSC)を入れたスライド洗浄バットを別に1つ用意します。回転子を中にいれておきます。
    バット3：洗浄バッファ2、回転子

注意 プロトコールで指定されている時間よりも長く、アレイが洗浄バッファに浸かってしまうのを避けるために、一度に洗浄するアレイの数は8枚以下にすることをお奨めします。

22. 洗浄中のアレイの乾燥を防ぐため、すばやく洗浄バッファから遠心機のラックにスライドを移動できるように、あらかじめ乾燥用の遠心機やバランス用のラック、スライドグラス等を準備しておきます。次の項の注意を参照ください。
23. 必要に応じてドライバー、ピンセットを準備します。オーブンからハイブリダイゼーションチャンバーを取り出します。チャンバーを洗浄バッファ1中で分解します。ランダムにネジを緩めるように注意してください。

注意 スライドによってはバッキングにくっついてしまうものもあります。慌てることなく、静かにバッキングからスライドを離します。マイクロアレイを傷つけないように、ご注意ください。

24. スライドを取り出し、室温の洗浄バッファ1がはいったバット2のラックにすばやく差し込みます。スライドガラスを扱うときは、バーコード部分を使います。決してマイクロアレイに触れることがないように注意してください。
25. 残りのハイブリダイゼーションチャンバーについても同様のステップを行います。
26. すべてのスライドをラックに差し込んでから、スターラーで洗浄バッファ1を攪拌します。回転速度は中程度にします。5分間、室温でこのステップを行います。
27. スライドラックを室温になっている洗浄バッファ2(0.06 × SSC)がはいったディッシュ3に移します。回転速度は中程度で2分間攪拌をおこないます。

スライドグラスの乾燥
(所用時間：2分)

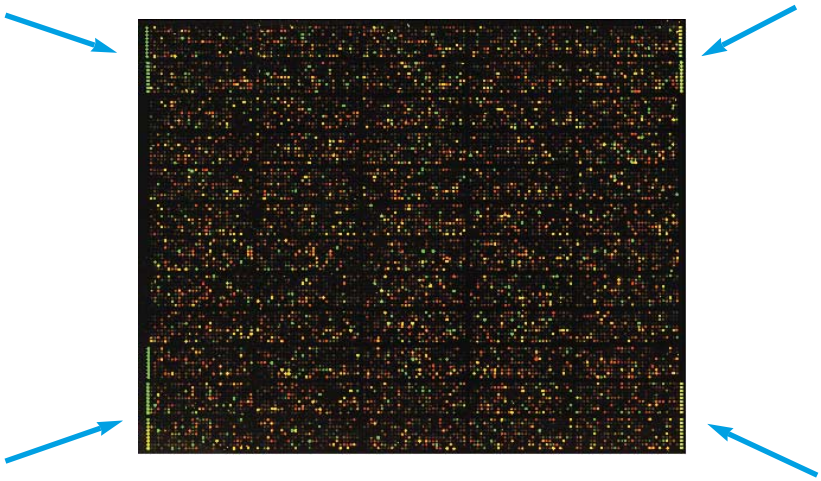
注意 このステップはできるだけ素早く行ってください。遠心にかける前にスライドが空気乾燥すると、乾燥した部分が跡となって残り、スポットの読み取りが困難になります。通常この「跡」はスキャン画像で、緑色の高い蛍光をもった跡となります。スライドラックごと、遠心機にセットして乾燥させる場合は、あらかじめローターにラックを固定し、バランスを保って回転できることを確認してください。

28. スライドラックをすばやく取り出し、遠心機のマイクロプレート用ローターにセットし、室温で2分間、400 × gで遠心し、スライドを乾かします。
29. スライドをスキャンします。スキャン後は、蛍光色素の光脱色を防ぐため、専用のプラスチック容器に入れて暗所で保管します。アジレントでは真空デシケータあるいは窒素パージボックス内で保管することをお勧めしています。

ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの画像化

何種類かのマイクロアレイ用スキャナが市販されています。アジレントマイクロアレイはCyanine 3とCyanin 5でラベル化したcDNAを使用しているので、Cyanine 3とCyanin 5を励起し、蛍光を検出できるスキャナが必要です。(532と633 nmのレーザー)。アジレントではアジレントマイクロアレイスキャナ(製品番号G2565AA)を推奨しています。アジレントマイクロアレイスキャナはダイナミックオートフォーカス機能を備えており、高感度かつハイスループットでアレイを読み取ることができます。アジレント社以外のスキャナをご使用の場合は、そのスキャナの取り扱い説明書をご参照ください。スキャン時にスライドグラスを取り扱う際は、「AGILENT」とプリントされている面にアレイがプリントされていることに注意してください。

付録の項目に、アジレントアレイのスライド上のスポット位置を記した図があります。アジレント以外のスキャナをお持ちのお客様は、この情報をご参照の上、各スキャナの取り扱い説明に従ってスキャンを行ってください。



矢印はコントロールプローブ位置を示しています。コントロールプローブはオペロンから販売されているデポジションコントロールターゲットと特異的にハイブリダイズします。

注意 アジレントのフィーチャエクストラクションソフトウェアを使用する場合は、常にコントロールプローブセットが3つならんでいる隅が、左下に位置するようにしてください。3つ並んでいるコントロールプローブセットは常にバーコードの一番近くに位置しています。

アジレントマイクロアレイキットに添付されているCD-ROMには、アレイのレイアウトと、スポットされていないプローブの情報のファイルが含まれています。“アレイデザインファイル”(ファイル名に_D_が入っている)には、アレイ上にプリントされているオリゴヌクレオチドプローブの位置とアジレントID番号(プローブ名)とTIGR ID番号が含まれています。また公的データベースに情報があるプローブに関しては、それぞれのオリゴヌクレオチドプローブの遺伝子名、アノテーションが含まれています。

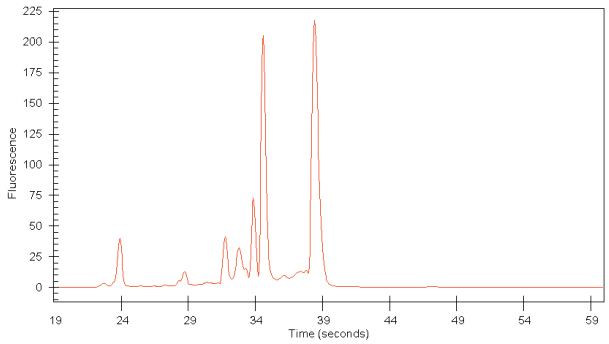
“アレイデフェクトファイル”（ファイル名に_P_が入っている）にはバッチテストの結果（正しくスポットされていないプローブの情報）が記載されています。アジレント フィーチャエクストラクションソフトウェアを使用した場合、これらのスポットは自動的に使用しないように設定されます。アジレント社以外のソフトウェアを利用してデータ解析を行う場合は、このアレイデフェクトファイルを参照し、デフェクトスポットを使用しないようにしてください。
“アレイデザインファイル”と“アレイデフェクトファイル”には、3種類のファイルフォーマットがあります。.xmlの拡張子がついたGEML-based filesはアジレントのマイクロアレイスキャナに付属しているフィーチャエクストラクションソフトウェアで使用します。.txtの拡張子がついたテキストファイル（tabで区切られている）は、他社製のソフトウェアでデータ解析をするときにご利用ください。各ファイルの詳しい情報、アジレント フィーチャエクストラクションでのファイルの使い方、アジレント以外のソフトウェアへの対応についてはCD-ROMにあるREADME.txtをお読みください。

注意 アジレント社以外のスキャナを使用してスキャンする場合：アジレント社のスキャナは、アレイ面を裏側からスキャンしますが、アジレント社以外のスキャナでは、アレイ面の表面からスキャンするタイプが多いです。アジレント社以外のスキャナを使用して、画像ファイルを作成した場合、その画像がミラーイメージになっていたり、回転していることがあります。もし、お使いのスキャナに、画像の反転や回転機能がついていたら、その機能を利用して、各スポット（フィーチャ）番号とアレイデザインファイルのフィーチャ番号が一致するようにしてください。もし、お使いのスキャナに画像の反転や回転機能がついていない場合は、お手持ちのスキャナでのアレイの読み取り方向をよく確認した上で、アレイのデザインファイルをスキャナの画像ファイルに適合するように変える必要があります。不明な点は、横河アナリティカルシステムズ株式会社のバイオサポート担当（TEL 0120-477-111）に直接ご確認ください。

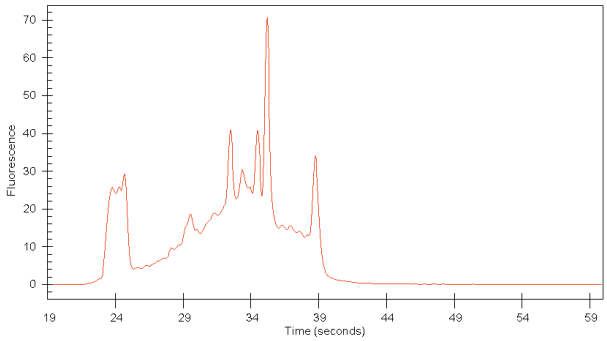
注意 ご使用のcDNAマイクロアレイとスキャナの画像ファイルに適合したレイアウトを、付録の中から参照ください。付録の中には、表面からスキャンするタイプのスキャナで読み取った、典型的な画像ファイルとフィーチャの位置のマップがあります。また、アジレント社のホームページから、他社のスキャナで読み取った場合の様々な向きに対応して、遺伝子を並べ替えたリストを入手いただくことができます。
http://www.chem.agilent.com/cag/bsp/pp4_1.asp
お手持ちのアレイのラベルに記載されているRUN番号（ _R_ ）を入力ください。アレイのデザインファイルは複数存在する場合がありますので、必ずご使用になったアレイのラベルについているRUN番号を用いて、お手持ちのスキャナの読み取り向きに適合したデザインファイルをダウンロードしてください。

付録 1
アラビドプシス RNA の調製

高品質の Arabidopsis RNA



分解を受けている Arabidopsis RNA



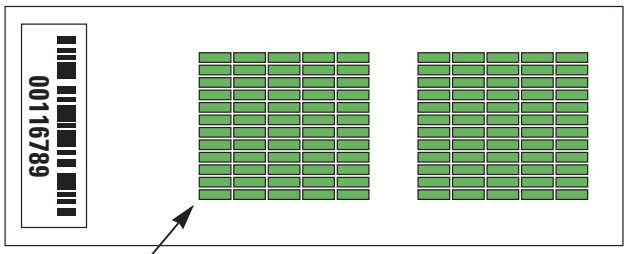
Arabidopsis RNA を取り扱う際には、RNA を分解してしまうヌクレアーゼの混入にご注意ください。ラベル化の前に、Agilent2100 バイオアナライザ、 RNA 6000 ナノキットもしくは電気泳動にてサンプルの品質をご確認ください。高品質の Arabidopsis RNA には、顕著な 2 本の rRNA のバンドと Arabidopsis の葉緑体由来の plastid ribosomal の小さなバンドがいくつか確認できます。高品質の Arabidopsis RNA と分解を受けている Arabidopsis RNA では、ベースラインの形状が大きく違うことにご注意ください。

植物または菌類から抽出した RNA には、高濃度のセルロースと多糖類が混入していることがあります。多糖類や二次代謝産物は OD の測定に影響し、RNA の定量が正しくできなくなります。これらの物質が混入した場合、RNA 溶液が白濁して見えることがあり、UV の照射によって蛍光を発する原因となります。さらに、セルロースや多糖類の混入はラベル化反応を阻害する可能性があるので、ラベル化の前に取り除く必要があります。これらの物質を取り除くために、さまざまなキット（Ambion, Inc. RNAqueous Kit, cat.no.1912 と Plant RNA Isolation Aid, cat.no.9690 を組み合わせて使用、または Qiagen Inc. RNeasy Plant Mini Kit, cat. nos. 74903&74904 など）が市販されています。

付録２
マイクロアレイのレイアウトと向き

アジレント社のスキャナで読み込んだ画像ファイルでの アジレント アラビドプシス１ マイクロアレイレイアウト

マイクロアレイは"Agilent"と書かれている面にプリントされています。



左（Left）
マイクロアレイ“A_01”

左（Right）
マイクロアレイ“A_02”

アジレント社のスキャナは、ガラス
を通してアレイをスキャンします。
（アレイ面の裏側からスキャン）

アジレント アラビドプシス1マイクロアレイのレイアウトは、アジレント社のスキャナで読み込んで作成した画像ファイルのフィーチャのレイアウトを元に作られています。アジレント社のスキャナは、専用のスライドフォルダーでしっかり固定したスライドガラスを通して、アレイの裏面をスキャンします。つまり、アジレント社のスキャナでスキャンしているときは、アレイの裏面（数値とバーコードのみの側）が表になり、アレイ面（“Agilent"の文字がついた側）はスライドフォルダ側を向きます。このようにアレイ面を裏返してスキャンすることにより、アレイ面をホコリなどから保護しています。
アジレントのアラビドプシス1マイクロアレイキットに添付されているCD中の、“アレイデザインファイル”は、アジレント社のスキャナで取り込んだ画像ファイルに合わせたレイアウトになっています。アジレント社以外のスキャナで取り込んだ画像は、反転（ミラーイメージ）や回転していることが多いので、デザインファイルに基づいてフィーチャ番号を各フィーチャ（スポット）にアサインするときには十分注意してください。

アジレント社以外のスキャナを使用してスキャンする場合

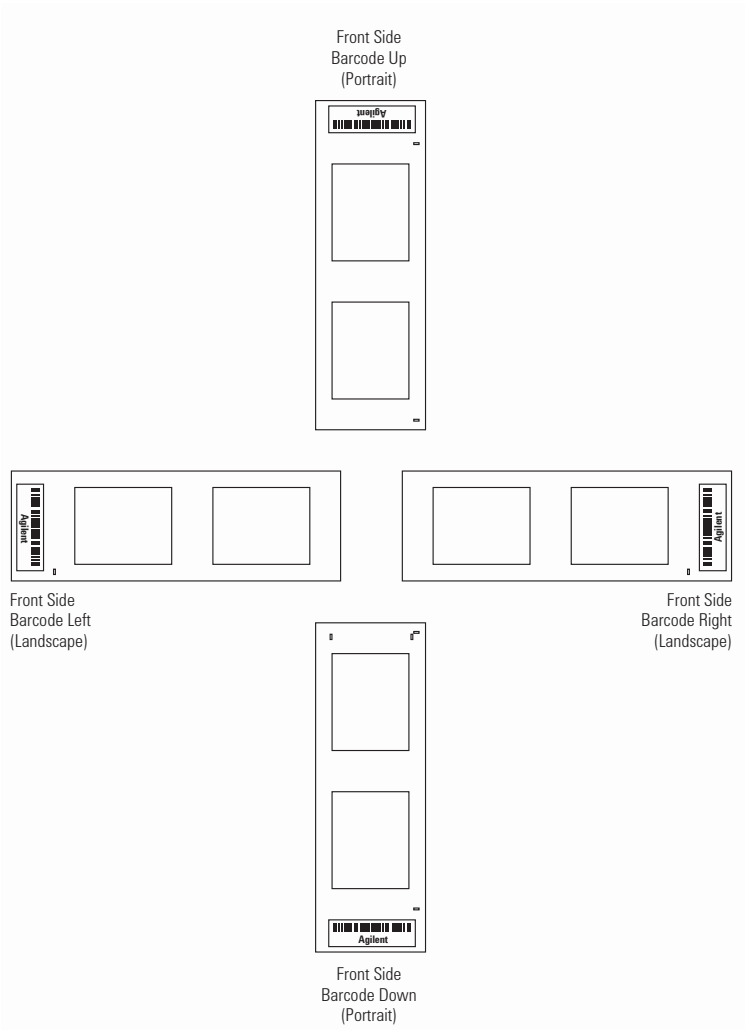
アジレントアラビドプシス1マイクロアレイをスキャンして得られた画像については、次の点をよく確認してください。

1) アレイの表面側(front side)からスキャンをしているか。(Agilentの文字が入っているバーコード側からスキャン)
2) 得られたイメージ画像が、スライドグラスを横方向(landscape)にスキャンしたものか。縦方向(portrait)にスキャンしたものか。(得られたイメージに対して、バーコードラベルが上下左右のどこに位置しているか)

アジレントアラビドプシス1マイクロアレイキットに添付されているCD中の“アレイデザインファイル”は、前述のアジレント社スキャナで読み込んだイメージを元に作られていますので、確認したイメージ画像の向きと方向によって、フィーチャの位置が変わり、フィーチャ番号を並べ替える必要があります。もっともよく使用されているスキャン方向である“Front Side Barcode Down(Portrait)については、フィーチャ番号を並べ替えた表を付録に添付しました。また、これらのレイアウトについては、アジレント社のホームページから、他社のスキャナで読み取った場合の様々な向きに対応して、遺伝子を並べ替えたリストを入手いただくことができます。

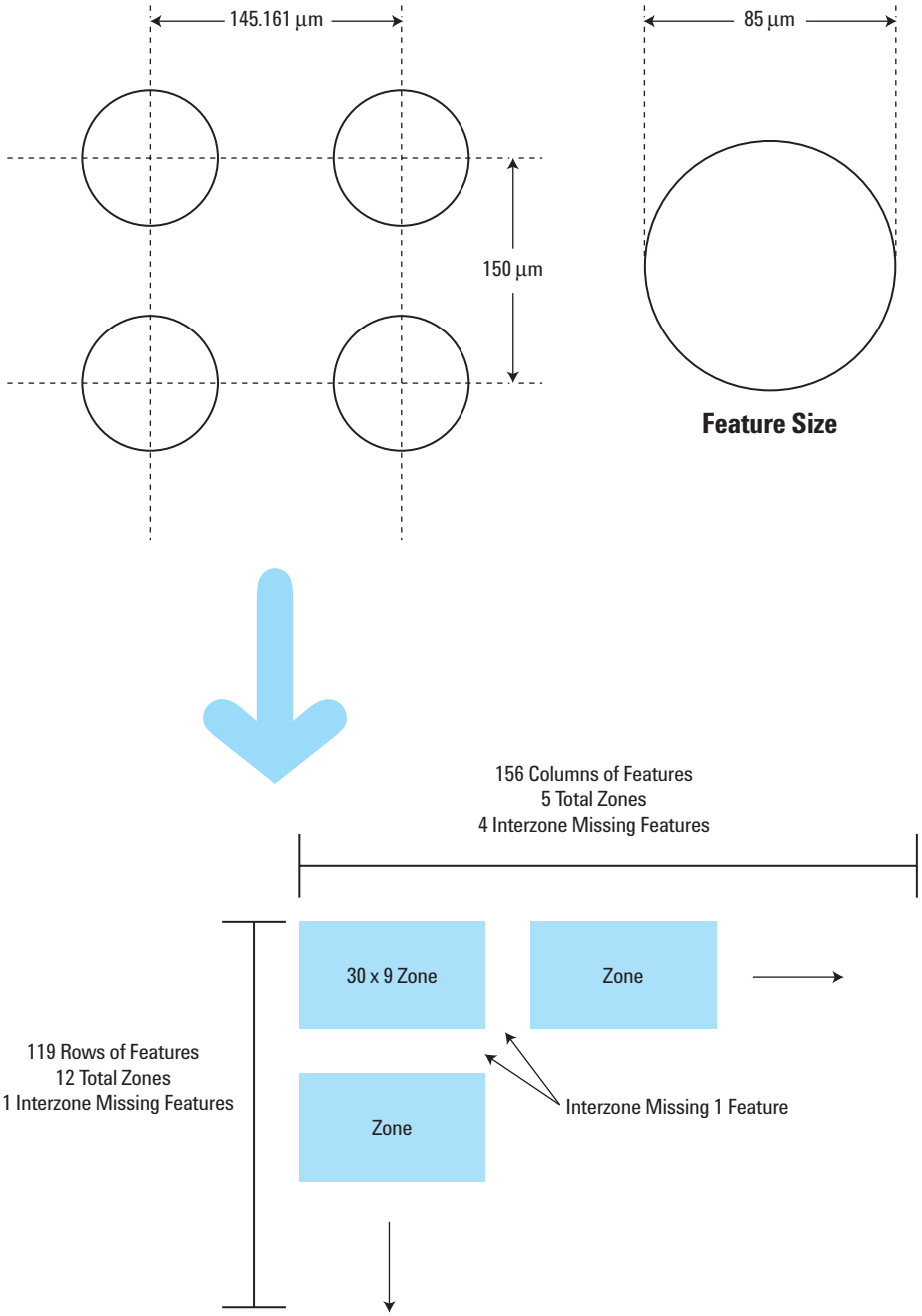
http://www.chem.agilent.com/cag/bsp/pp4_1.asp

お手持ちのアレイのラベルに記載されているRUN番号(_R_)を入力ください。アレイのデザインファイルは複数存在する場合がありますので、必ずご使用になったアレイのラベルについているRUN番号を用いて、お手持ちのスキャナの読み取り向きに適合したデザインファイルをダウンロードしてください。
不明な点は横河アナリティカルシステムズ株式会社のバイオサポート担当者にご相談ください。(p12 ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイの画像化の章を合わせてご参照ください。)



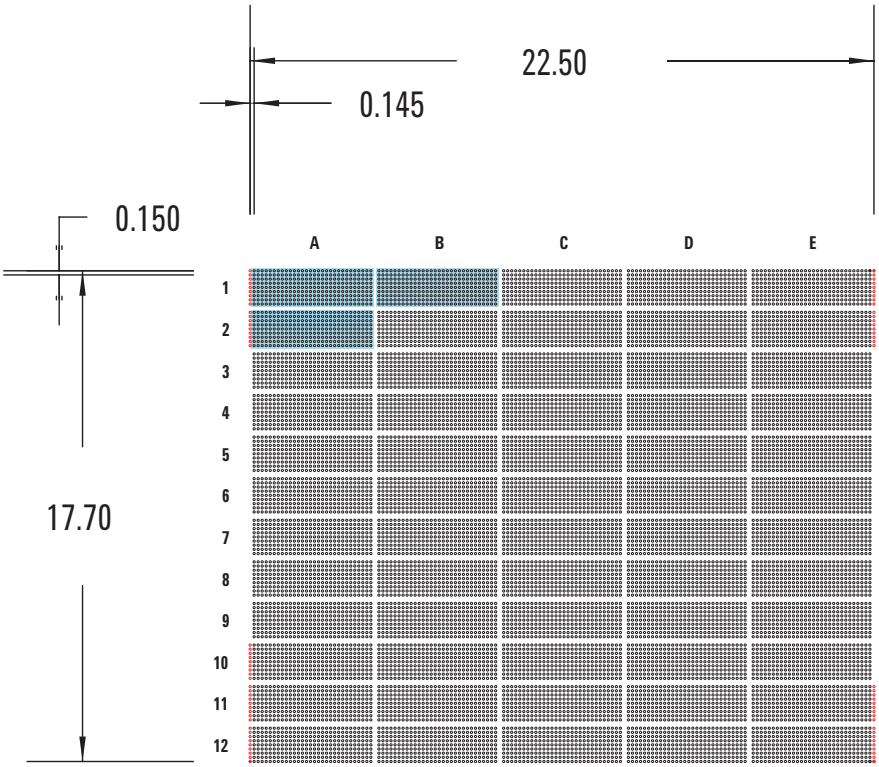
付録３
アラビドプシス１マイクロアレイ

フィーチャ（スポット）のサイズとレイアウト



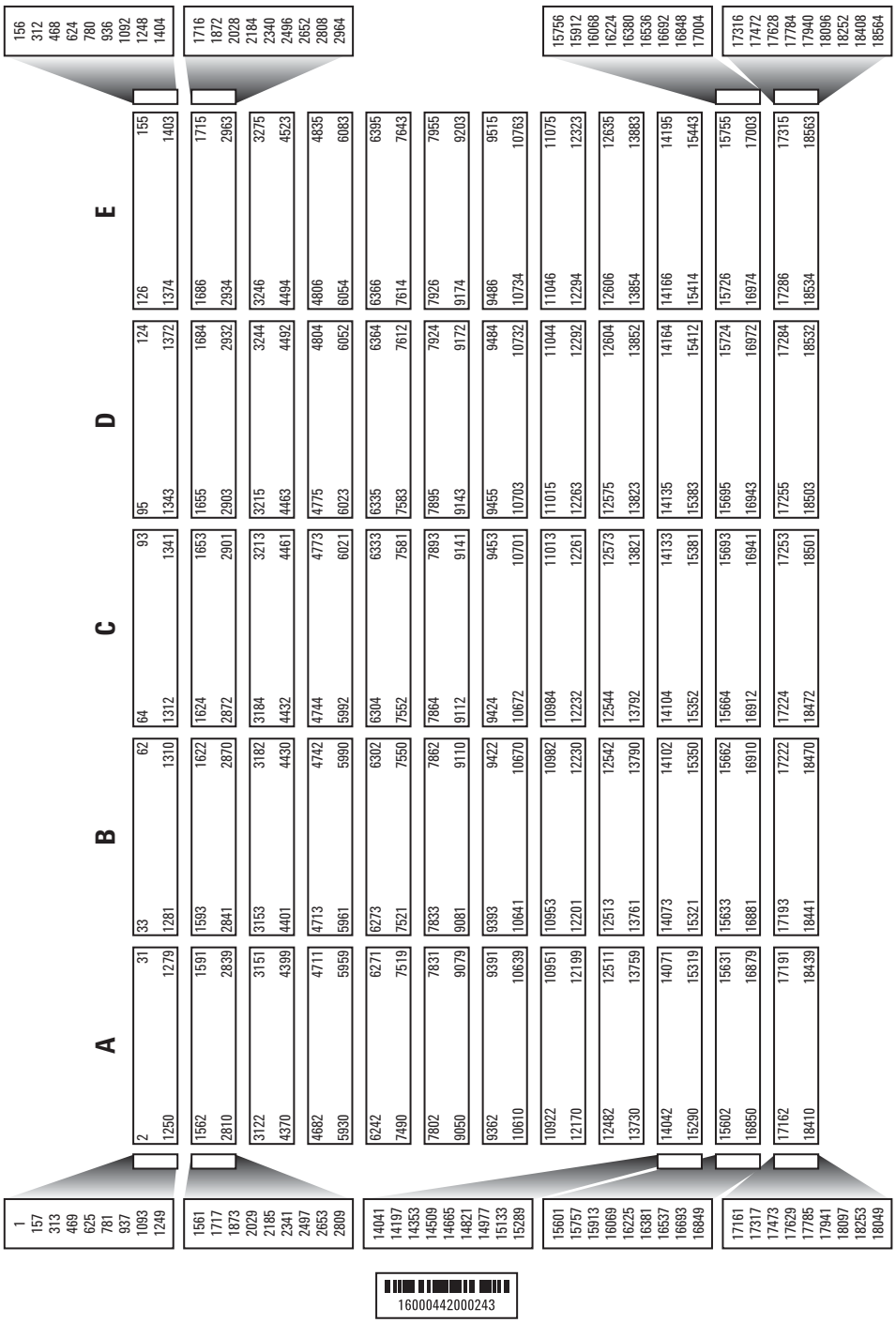
アラビドプシス 1 マイクロアレイ

(each zone is made up of 30 x 9 features)
Average feature size = 80 microns



Measurements in millimeters

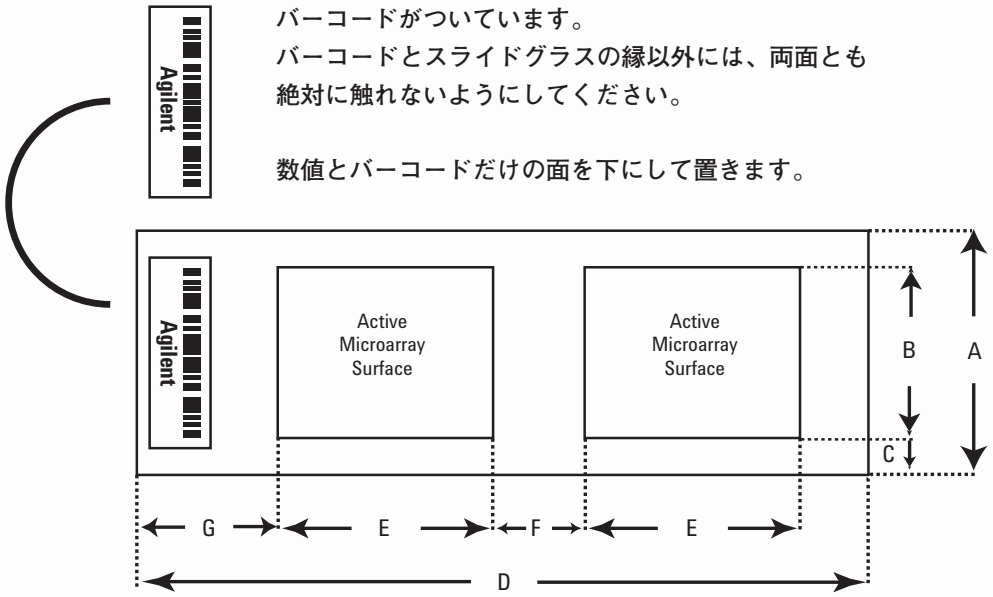
アラビドプシス１マイクロアレイのフィーチャ番号
アジレント社スキャナ（G2565AA）を使用した場合



アラビドプシス 1 マイクロアレイ
アジレント社以外のスキャナを使用した場合

アレイが載っている面には、Agilent と書かれている
バーコードがついています。
バーコードとスライドグラスの縁以外には、両面とも
絶対に触れないようにしてください。

数値とバーコードだけの面を下にして置きます。

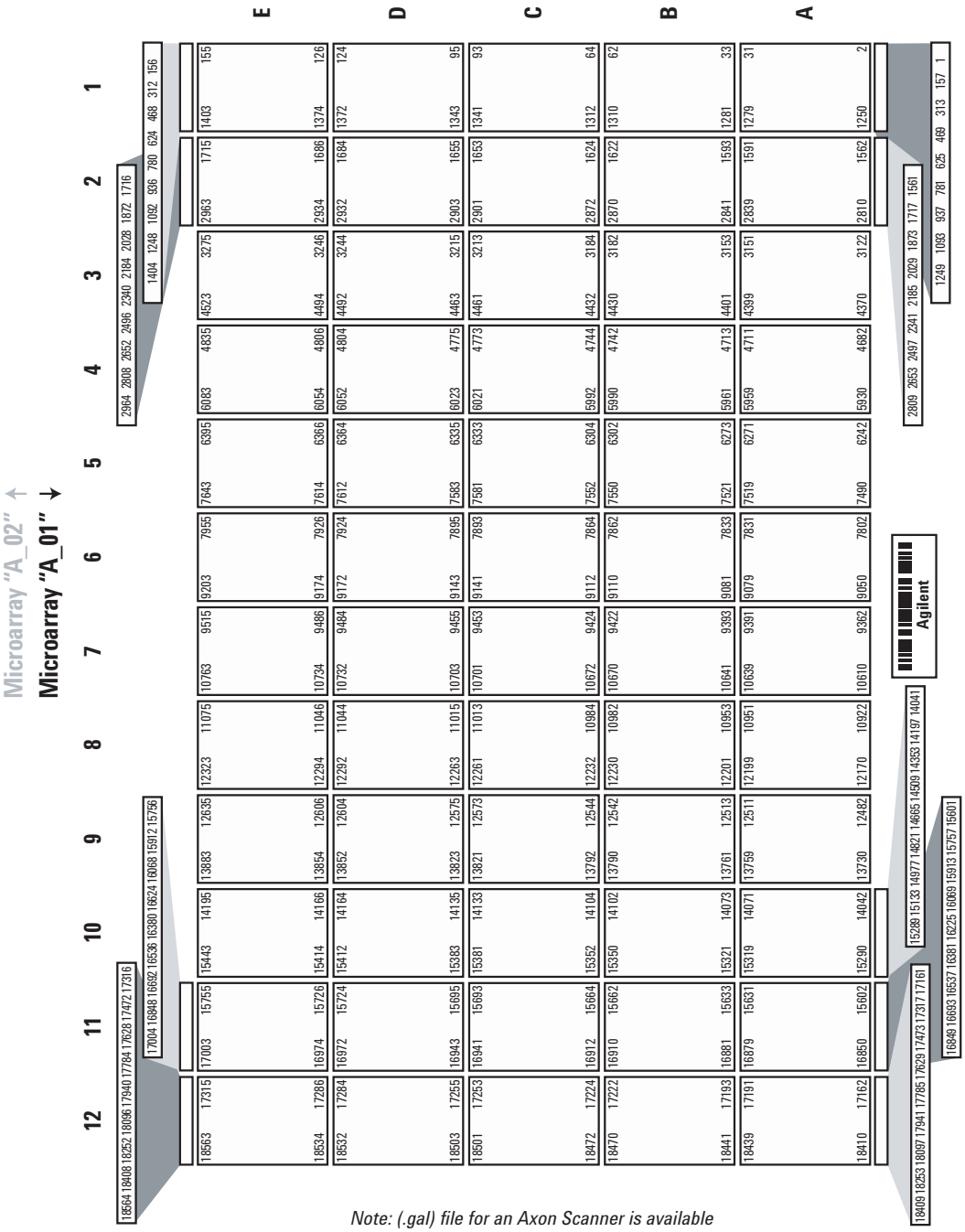


マイクロアレイの配置とサイズ
（スキャナ読み取り時にご参照ください。）

Glass thickness (1mm glass +/- 0.025mm)

A= 25.40mm (+0.15mm or -0.75mm)
B= 17.70mm
C= 3.35mm
D= 76.2mm (+/- 0.1mm)
E= 22.5mm
F= 9.5mm
G= 14.7mm

アラビドプシス１マイクロアレイのレイアウト
アジレント社以外のスキャナを使用した場合
(Front Side, Portrait, Barcode Downのタイプ
例：Axon, PE/Packard)



Note: (.gal) file for an Axon Scanner is available on the Agilent Arabidopsis 1 Microarray Kit CD.

Notes Page

Agilent's Printed Microarray Solutions

Design it!	**Microarray Design Services**
G2560A	Microarray Design and Basic QC
G2561A	Probe Selection
G2562A	Probe Curation
G2563A	Professional Consulting Service
Print it!	**cDNA and Custom Microarrays**
G2506A	25-mer Custom Oligonucleotide Microarray (8.4K)
G2507A	25-mer Custom Oligonucleotide Microarray (22K)
G2508A	60-mer Custom Oligonucleotide Microarray (8.4K)
G2509A	60-mer Custom Oligonucleotide Microarray (22K)
G4100A	Human 1 cDNA Microarray Kit
G4101A	Human 2 cDNA Microarray Kit
G4104A	Mouse cDNA Microarray Kit
G4105A	Rat cDNA Microarray Kit
G4135A	Arabidopsis 1 Microarray Kit
Run it!	**Microarray Processing Tools**
G2554A	Fluorescent Linear Amplification Kit
G2556A	Fluorescent Linear Amplification Kit with Hyb'n Reagent
G2559A	*in situ* Hybridization Reagent Kit
G2557A	Fluorescent Direct Label Kit
G2555A	Fluorescent Direct Label Kit with Hybridization Reagent
G2558A	Deposition Hybridization Reagent Kit
G4145A	Large Volume Deposition Hybridization Kit
G2530A	Microarray Hybridization Chamber (8.4K format)
G2530-60002	Hybridization (8.4K format) Septa, Backings & Gasket
G2533A	Microarray Hybridization Chamber (16.2K format)
G2533-65002	Hybridization (16.2K format) Septa, Backings & Gasket
G2531A	Microarray Hybridization Chamber (22K format)
G2531-60002	Hybridization (22K format) Septa, Backings & Gasket
G2940BA	2100 Bioanalyzer Instrument System Bundle
5065-4476	RNA 6000 Nano LabChip Kit (messenger & total RNA)
5064-8230	DNA 7500 LabChip Kit (100 - 7500 bp)
5064-8231	DNA 12000 LabChip Kit (100 - 12000 bp)
5064-8284	DNA 500 LabChip Kit (25 - 500 bp)
5065-4449	DNA 1000 LabChip Kit (25 - 1000 bp)
G2565AA	48-slide, Dual Laser DNA Microarray Scanner
(# varies)	Microarray Technology Transfer, Services and Support Packages
Discover it!	**Microarray Analysis**
G2567AA	Feature Extraction Software License
(# varies)	Rosetta Resolver® Gene Expression Data Analysis System

Agilent Technologies
BioResearch Solutions Unit
1601 California Avenue
Palo Alto, CA 94034
E-mail: dna_microarrays@agilent.com

http://www.agilent.com/chem/dna

Part Number: G4135-96000

Information, descriptions and specifications are subject to change without notice. Please register online with Agilent to receive new product updates at:
www.agilent.com/chem/printit
(enter access code: BR3003).

Rosetta Resolver is a US registered trademark of Rosetta Inpharmatics.

Agilent Technologies